

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-327290

(43)公開日 平成9年(1997)12月22日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 H 1/08			C 0 7 H 1/08	
	21/04			B
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平8-149127	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成8年(1996)6月11日	(72)発明者	石田 由和 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	池田 勝徳 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	上村 秀喜 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プラスミドDNAの抽出精製方法

(57)【要約】

【課題】 プラスミドDNAを含む微生物または細胞からプラスミドDNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度でRNAを抽出し、精製する方法を提供する。

【解決手段】 下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするプラスミドDNAの抽出精製方法および該方法に使用するプラスミドDNA抽出精製試薬キット。

(a) プラスミドDNAを保持する微生物または細胞に、カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液、有機溶媒からなる抽出液および核酸結合性固相担体を添加、混合あるいは接触させることにより、該プラスミドDNAを固相担体上に吸着させ、(b)上記(a)工程にてプラスミドDNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、かつ、(c)上記(b)工程にて洗浄した固相担体から、溶出液によりプラスミドDNAを溶出させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程（a）～（c）を含むことを特徴とするプラスミドDNAの抽出精製方法。

（a）プラスミドDNAを保持する微生物または細胞に、カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液、有機溶媒からなる抽出液および核酸結合性固相担体を添加、混合あるいは接触させることにより、該プラスミドDNAを固相担体上に吸着させ、

（b）上記（a）工程にてプラスミドDNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、かつ、

（c）上記（b）工程にて洗浄した固相担体から、溶出液によりプラスミドDNAを溶出させる。

【請求項2】 プラスミドDNAを保持する微生物または細胞がバクテリアである請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項3】 カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液が、グアニジンチオシアン酸塩および酢酸ナトリウム塩酸（pH4.0）を含む請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項4】 有機溶媒が水飽和または緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、またはこれらの組み合わせである請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項5】 核酸結合性固相担体がシリカを含む担体である請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項6】 核酸結合性固相担体が粒子である請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項7】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子である請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項8】 抽出液が水あるいはTEバッファーである請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項9】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む単体であって、さらに磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含む請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項10】 カオトロピックス物質を含むpH3～6の溶解液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合用固相担体、洗浄液および溶出液を含むプラスミドDNA抽出精製試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞から、核酸結合性固相担体を用いてプラスミドDNAを簡便かつ純度よく抽出する方法ならびに該方法に用いるためのプラスミドDNA抽出精製試薬キットに関する。該試薬キットは自動核酸抽出装置にも応用しうる。

【0002】

【従来の技術】核酸を含有する細胞等の生物材料からの核酸の抽出精製は、遺伝子工学や臨床診断の分野では重

要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞等の生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA/RNA診断においても、血液等の生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、検出することが必要である。一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAといった核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身もタンパク質との複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破碎処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を施すことにより核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破碎物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている。

【0003】プラスミドDNAを保持するバクテリア、特に大腸菌からプラスミドDNAを抽出する方法としては、アルカリ溶菌法、ボイル法[Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]などが従来より行われてきた。しかし、これらの方法は遠心分離など煩雑な工程を含むため非常に手間がかかる作業である。さらに、これらの方法により抽出されたDNAサンプル中には、その後の解析にとって弊害となるRNAやタンパク質などが多く含まれている。そのため、純度よくプラスミドDNAを得るためには、これらの抽出操作を行った後に、塩化セシウムによる密度勾配を利用した超遠心分離操作や、リボヌクレアーゼ消化およびフェノール/クロロホルム抽出に代表されるような煩雑で、かつ長時間を要するRNAおよびタンパク質除去操作を行う必要がある。

【0004】また、ゲノムDNAおよびタンパク質除去操作を特に行う必要がなく、簡便にプラスミドDNAを抽出しうる方法として、ヒドロキシアパタイトを核酸結合性固相として使用する方法[Beland, F. A. ら, J. C chromatography, 174, 177-186(1979)]が知られている。この方法によれば、溶菌液中のプラスミドDNAのみを抽出してることが可能であり、RNAやタンパク質はヒドロキシアパタイトにほとんど吸着しないため、これらの混入をほとんど防ぐことができる。しかし、この方法では、溶出液として制限酵素消化等の酵素反応を阻害する0.3Mリン酸緩衝液などの比較的高濃度の緩衝液を使用する。そのため、抽出したプラスミドDNAを制限酵素消化やシーケンシングなどの解析に使用する場合には、透析やゲルろ過等を施すことにより緩衝剤を除去することが必要となり、長時間を要するという問題があ

る。

【0005】一方、簡便な核酸抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法がある【特開平2-289596号公報】。この方法は、バクテリアなどの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能なおうえ、溶出液として水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、特別な脱塩濃縮操作が不要で、抽出した核酸を直ちに後の解析に使用することができるという利点がある。しかし、この方法によりプラスミドDNAを保持するバクテリアからプラスミドDNAの抽出を試みた場合、ゲノムDNAもプラスミドDNAと同様にシリカへ吸着する。そのため、プラスミドDNAのみを純度よく抽出するためには、さらに超遠心分離やカラムクロマトグラフィー等の精製操作をおこなうことが必須である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来から存在する技術の上記問題点を解決することであり、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞からプラスミドDNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度で抽出し、精製する方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、適当な細胞溶解液、有機溶媒および核酸結合性固相担体により、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞からプラスミドDNAを簡便に抽出精製しうることを見出し、本発明に達した。

【0008】すなわち、本発明は下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするプラスミドDNAの抽出精製方法である。

(a) プラスミドDNAを保持する微生物または細胞に、カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液、有機溶媒からなる抽出液および核酸結合性固相担体を添加し、混合あるいは接触させることにより、該プラスミドDNAを固相担体上に吸着させ、(b) 上記

(a) 工程にてプラスミドDNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、かつ、(c) 上記(b) 工程にて洗浄した固相担体から、溶出液によりプラスミドDNAを溶出させる。

【0009】また、本発明はカオトロピックス物質を含むpH3～6の溶解液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合用固相担体、洗浄液および溶出液を含むプラスミドDNA抽出精製試薬キットである。

【0010】

【発明の実施態様】本発明によるプラスミドDNAの抽出精製方法は、(a) 溶解・吸着工程、(b) 洗浄工程、(c) 溶出工程の3段階に大きく分けられる。

【0011】(a) 溶解・吸着工程では、プラスミドD

NAを保持する微生物または細胞に細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体を添加、混合あるいは接触させることにより、微生物または細胞を溶解し、プラスミドDNAを核酸結合性固相へ吸着させる。

【0012】本発明において用いられるプラスミドDNAを保持する微生物または細胞としては、例えば大腸菌の形質転換体が代表的なものである。この大腸菌の形質転換体の場合、通常は、公知の常法にしたがって適当な選択培地を使用して終夜培養され、遠心分離などの操作により集菌されたものが出発材料として使用される。また、ここで抽出対象となるプラスミドDNAは、周知のとおり、ベクターとして利用されるものである。したがって、ここでいうプラスミドDNAにはコスミドDNAも当然含まれる。

【0013】本発明において用いられる細胞溶解液には、緩衝剤を含有させ、pH3～6とする。これは、あらかじめ細胞溶解液に含まれていても、また細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。この緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば特に限定されないが、pH3～6の範囲のいずれかのpHにおいて緩衝能を有するものがより好ましい。例えば、酢酸ナトリウム・酢酸、酢酸ナトリウム・塩酸等が挙げられ、その使用濃度としては1～500nm、pHは3～6の範囲が好適である。

【0014】本発明において用いられる細胞溶解液には、カオトロピック物質が含まれる。カオトロピック物質としては、一般にカオロピックス物質として知られているような、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、さらにプラスミドDNAの固相への結合に寄与するものであれば特に限定されない。具体的には、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、よう化ナトリウム、よう化カリウム、過塩素酸ナトリウム等が挙げられる。これらのうち、グアニジンチオシアン酸塩が好ましく用いられる。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なり、例えば、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合には、3～5.5Mの範囲となるように使用するのが好ましい。

【0015】また、細胞溶解液には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で界面活性剤を含有させてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば特に限定されないが、具体的には、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の非イオン界面活性剤、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシナトリウム、コール酸ナ

トリウム等の陰イオン界面活性剤、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が挙げられる。これらのうち、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等の非イオン界面活性剤が好ましく用いられる。これらの界面活性剤の使用濃度は、用いられる界面活性剤により異なり、例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを使用する場合には、0.1～3%の範囲となるように使用するのが好ましい。

【0016】本発明において用いられる有機溶媒としては、プラスミドDNAの固相への結合を妨げるものでなく、かつゲノムDNAの固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。この原理についての詳細は不明であるが、有機溶媒を液相に添加することにより液相の極性を適度に下げ、そのことによって、分子表面の極性が異なるプラスミドDNAとゲノムDNAに固相との結合の選択性を付与しているものと考えられる。本発明において用いられる有機溶媒の具体例としては、水飽和フェノール、緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、3-メチル-1-プロパノール、アセトン等が挙げられる。これらのうち、水飽和フェノールまたは緩衝液飽和フェノール、あるいはこれら飽和フェノールとクロロホルムを適当な割合で混合したものが好ましい。

【0017】本発明において用いられる核酸結合性固相担体としては、カオトロピックイオンの存在下で核酸を吸着、すなわち可逆的な結合により保持することができる親水性表面を有する固体であれば特に限定されない。具体的には、二酸化ケイ素、すなわちシリカが好ましく用いられる。また、前記のような核酸との可逆的な結合を妨げるようなものでなければ、シリカから構成される他の物質、例えばガラス、ケイソウ土、あるいはこれらを化学的修飾により表面処理を施したものや、超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。また、この核酸結合性固相担体の形態としては、粒子、フィルター、反応容器等が具体的に挙げられるが特に限定されない。これらのうち、吸着と溶出の効率を考慮すると粒子の形態がより好ましく、このとき粒径は0.05～500 μ mがより好適である。

【0018】本発明においては、上記細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相を別々に添加しても、あるいは同時に添加しても良い。

【0019】(b)洗浄工程は、細胞破砕物、細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体の混合物から、プラスミドDNAが吸着した核酸結合性固相担体のみを可能な限り分離する工程である。このとき、洗浄液を使用して1～3回程度、繰り返し洗浄するのが好ましい。

【0020】本発明における核酸結合性固相担体の分離のための具体的な手段としては、使用する固相担体の形態により異なる。例えば核酸結合性固相が粒子の形態で

ある場合には、遠心分離、ろ過、カラム操作等が好ましい。さらには、粒子内に超常磁性金属酸化物を含ませておいたものを固相担体として使用すれば、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能となり、より好適である。

【0021】本発明において用いられる洗浄液としては、固相からのプラスミドDNAの溶離を促進するものでなく、かつゲノムDNAやタンパク質の固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。具体的には、3～5.5Mグアニジンチオシアン酸溶液あるいは40%～100%エタノールが好ましく、これらの洗浄液を併用するとより好適である。つまり、まず、グアニジンチオシアン酸溶液で洗浄した後、さらに40%～100%エタノールで洗浄するのが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した細胞溶解液および有機溶媒を洗浄液として使用すると、ゲノムDNAとタンパク質の除去により有効である。このとき、続いて40%～100%エタノールで洗浄するのが好ましい。

【0022】(c)溶出工程は、プラスミドDNAが吸着した核酸結合性固相担体から該DNAを溶離させる工程である。従って、本発明において用いられる溶出液としては、固相からのプラスミドDNAの溶離を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはTEバッファー[10mMトリス塩酸緩衝液、1mM EDTA、pH8.0]が好ましい。このとき回収したプラスミドDNAは、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、制限酵素やDNAポリメラーゼ等を使用した酵素反応に直接使用することができる。

【0023】上記のように、本発明によるプラスミドDNAの抽出精製方法は、単純な工程から構成されるため、プラスミドDNA抽出精製キットや、固相の分離操作や試薬分注操作を自動化した核酸抽出装置へ容易に応用しうることには明らかである。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 大腸菌pBR322/HB101からのプラスミドDNAの抽出

(1)大腸菌pBR322/HB101の調製

プラスミドpBR322(東洋紡績社製)で形質転換された大腸菌HB101形質転換体(pBR322/HB101)を100 μ g/mlのアmpiシリンを含むLB培地[10g/lトリプトン、5g/l酵母エキス、5g/l塩化ナトリウム(pH7.5)]100mlに植菌し、培養温度37℃、振とう速度180rpmで15時間培養した。培養後、培養液を1.5mlずつ1.5ml容マイクロチューブに分注し、高速微量冷却遠心分離機(MR-150:トミー精工社製)にて12,000rpm、1分間遠心分離し、上清を除去することにより得られた菌体を抽出材料とした。

【0025】(2)プラスミドDNAの抽出精製

上記(1)にて調製した菌体に500 μ lの細胞溶解液[4.7Mグアニジンチオシアン酸、92mM酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)、1.2%ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、20mM EDTA]を加えて溶菌させ、続いて500 μ lのTEバッファ-飽和フェノール/クロロホルム(1:1)を加え、激しく混合した。これに、40 μ lの0.5g/ml磁性シリカ(粒径1~10 μ m、四三酸化鉄粒子30%含有、比表面積280m²/g、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2~6nm:鈴木油脂製)懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンド(MPC-M:ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドからはずし、1mlの洗浄液[5.3Mグアニジンチオシアン酸、52mMトリス塩酸(pH6.4)]を加えて十分に混合した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様にして、1mlの洗浄液にて再度、粒子を洗浄し、続いて1mlの70%エタノールで2回、100%エタノールで1回粒子を洗浄した。上清を除去した後、マイクロチューブを55℃に設定したヒートブロック上に設置し、20分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発除去し、粒子を乾燥させた。これに100 μ lの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ80 μ lであった。

【0026】回収液のうちの10 μ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン3)に示す。図1(レーン3)から明らかなように、大腸菌ゲノム由来DNAやRNAの混入はほとんど見られず、高い純度でプラスミドDNAが抽出精製されたことが確認できる。図1中、レーン1は、ラムダファージDNAのPstI消化物からなるサイズマーカー、レーン2は市販のpBR322DNAの泳動パターン、レーン3は実施例1に示す方法により抽出精製されたpBR322DNAの泳動パターン、レーン4は市販のpBR322DNAのEcoRI消化物の泳動パターン、レーン5は実施例1に示す方法により抽出精製されたpBR322DNAのEcoRI消化物の泳動パターンを示す。

【0027】(3)プラスミドDNAの制限酵素消化
上記(2)にて得られた回収液のうち8 μ lに1 μ lの10 \times Hバッファ[500mM トリス塩酸(pH7.5)、1M 塩化ナトリウム、100mM 塩化マグネシウム、10mMジチオスレイトール]、および1 μ lの1U/ μ lのEcoRI(東洋紡績社製)を添加混合し、37℃、3時間放置した。

【0028】反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン5)に示す。図1(レーン5)から明らかなように、本発明による方法にて抽出精製されたプラスミド

DNAは、制限酵素EcoRIによって完全に切断されており、直ちに、制限酵素消化に使用できることが確認できる。

【0029】実施例2 大腸菌pUC19/JM109からのプラスミドDNAの抽出

(1)大腸菌pUC19/JM109の調製
プラスミドpUC19(東洋紡績社製)で形質転換された大腸菌JM109の形質転換体(pUC19/JM109)を100 μ g/mlのアmpiシリンを含むSB培地[32g/lトリプトン、20g/l酵母エキス、5g/l塩化ナトリウム、5ml 1N NaOH]100mlに植菌し、培養温度37℃、振とう速度180rpmで15時間培養した。培養後、培養液を1.5mlずつ1.5ml容マイクロチューブに分注し、高速微量冷却遠心分離機(MR-150:トミー精工社製)にて12,000rpm、1分間遠心分離し、上清を除去することにより得られた菌体を抽出材料とした。

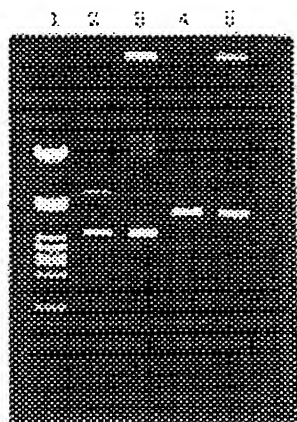
【0030】(2)プラスミドDNAの抽出精製
実施例1と同様な方法にして、上記(1)にて調製した菌体からプラスミドpUC19 DNAを抽出精製した。菌体に600 μ lの細胞溶解液[5Mグアニジンチオシアン酸、100mM 酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)]を加えて溶菌させ、続いて300 μ lのTEバッファ-飽和フェノールを加え、激しく混合した。これに、40 μ lの0.5g/ml磁性シリカ(粒径1~10 μ m、四三酸化鉄粒子30%含有、比表面積280m²/g、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2~6nm:鈴木油脂製)懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンド(MPC-M:ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドからはずし、洗浄液として750 μ lの細胞溶解液[5Mグアニジンチオシアン酸、100mM 酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)]と150 μ lのTEバッファ-飽和フェノールを加えて十分に混合した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様にして、再度、粒子を洗浄し、続いて1mlの70%エタノールで2回粒子を洗浄した。上清を除去した後、これに100 μ lの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ100 μ lであった。

【0031】回収液のうちの3 μ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2(レーン3)に示す。図2(レーン3)から明らかなように、大腸菌ゲノム由来DNAやRNAの混入はほとんど見られず、高い純度でプラスミドDNAが抽出精製されたことが確認できる。

【0032】(3)プラスミドDNAの制限酵素消化
実施例1と同様にして、上記(2)にて得られた回収液のうち、8 μ lに1 μ lの10 \times Lバッファ[100mM トリス塩酸(pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、10mM

ジチオスレイトール]、および $1\mu\text{l}$ の $1\text{U}/\mu\text{l}$ のKpnI（東洋紡績社製）を添加混合し、 37°C 、3時間放置した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2（レーン5）に示す。図2（レーン5）から明らかなように、本発明による方法にて抽出精製されたプラスミドDNAは、制限酵素 KpnI によって完全に切断されており、直ちに制限酵素消化に使用できることが確認できる。図2中、レーン1は、ラムダファージDNAの PstI 消化物からなる分子量マーカー、レーン2は市販の pUC19 DNAの泳動パターン、レーン3は実施例2に示す方法により抽出精製された pUC19 DNAの泳動パターン、レーン4は市販の pUC19 DNAの KpnI 消化物の泳動パターン、レーン5は実施例2に示す方法により抽出精製された pUC19 DNAの KpnI 消化物の泳動パターンを示す。

【図1】



【0033】

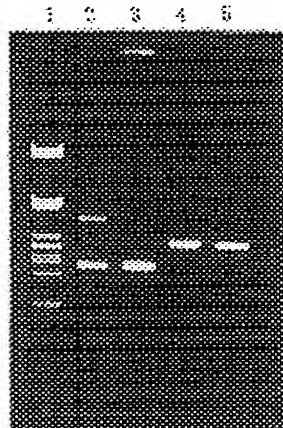
【発明の効果】本発明によれば、カオトロピック物質を含む pH が 3～6 である溶解液と核酸結合用固相担体を使用することにより、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞から、高純度なプラスミドDNAを特異的に吸着させ、さらに適当な溶出液を使用することにより、煩雑な後処理操作を必要とすることなく短時間かつ簡便にプラスミドDNAを抽出精製することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法により抽出精製されたプラスミド pBR322 DNAとその制限酵素消化物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図2】本発明の方法により抽出精製されたプラスミド pUC19 DNAとその制限酵素消化物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

[Title of the Invention] Method of extracting and purifying plasmid DNAs

[Claims]

[Claim 1] A method of extracting and purifying plasmid DNAs which comprises the following steps (a) to (c):

(a) the step of adding, mixing or contacting a cytolytic solution containing a chaotropic substance and having a pH of 3-6, an extractant comprising an organic solvent and a nucleic acid-binding solid phase carrier to or with a microorganism or cells harboring a plasmid DNA to thereby cause the plasmid DNA to be adsorbed on the solid carrier,

(b) the step of washing the solid carrier with the plasmid DNA adsorbed thereon in the above step (a) with a washing solution, and

(c) the step of eluting, with an eluent, the plasmid DNA from the solid carrier washed in the above step (b).

[Claim 2] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the plasmid DNA-harboring microorganism or cells are a bacterial strain or bacterial cells.

[Claim 3] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the chaotropic substance-containing cytolytic solution having a pH of 3-6 contains guanidine thiocyanate and sodium acetate-hydrochloric acid (pH 4.0).

[Claim 4] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the organic solvent is water-saturated or buffer-saturated phenol or chloroform or a combination of these.

[Claim 5] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier is a silica-containing carrier.

[Claim 6] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier occurs as particles.

[Claim 7] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier occurs as superparamagnetic metal oxide-containing particles.

[Claim 8] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the extractant is water or a TE buffer.

[Claim 9] [1] A method of extracting and purifying plasmid DNAs as set forth in Claim 1, wherein the nucleic acid-binding solid phase carrier is a superparamagnetic metal oxide-containing carrier, said method further comprising the step of separating the nucleic acid-binding solid phase carrier and the liquid phase from each other utilizing a magnetic force.

[Claim 10] A reagent kit for plasmid DNA extraction and purification which comprises a lyzing solution containing a chaotropic substance and having a pH of 3-6, an extractant comprising an organic solvent, a nucleic acid-binding solid phase carrier, a washing solution and an eluent.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Field of Utilization] The present invention relates to a method of extracting plasmid DNAs from plasmid DNA-harboring microorganisms or cells in a simple and easy manner and at high purity levels using a nucleic acid-binding solid phase carrier and to a plasmid DNA extraction/purification reagent kit for use in said method. The reagent kit can be applied to an automated nucleic acid extraction apparatus as well.

[0002]

[Prior Art] Nucleic acid extraction/purification from such a biological material as nucleic acid-containing cells is an important step in the field of genetic engineering or clinical diagnosis. In the case of analyzing a gene, for instance, it is first necessary to extract a nucleic acid, namely DNA or RNA, from such a biological material as cells containing that gene. Further, in DNA/RNA diagnosis for detecting an infectious factor such as a bacterial or viral strain, it is also necessary to extract bacterial or viral nucleic acids from a biological material, typically blood, for detection of such matter. Generally, nucleic acids such as DNAs and RNAs contained in biological materials are not always in the free form but occur in such shells as cellular membranes and cell walls constituted of proteins, lipids and saccharides; in most cases, nucleic acids themselves occur as conjugates with proteins. Therefore, when nucleic acids are to be extracted and purified from a biological material, it is necessary to first render nucleic acids free by subjecting the material to physical disruption treatment by ultrasonic waves or heat, enzymatic treatment with protease, or treatment with a surfactant or denaturant, for instance, and then further purify the nucleic acids from the disruption product, for example, by an extraction procedure using an organic solvent such as phenol, ultracentrifugation, and/or column chromatography using such a carrier as an ion

exchanger. These techniques are respectively optimized and are used in combination according to the nucleic acids, the starting material and, further, the intended use of the nucleic acids extracted.

[0003] The conventional methods of extracting plasmid DNAs from plasmid DNA-harboring bacteria, in particular *Escherichia coli*, include the alkaline lysis method and the boiling method [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)], among others. However, these methods comprise such a complicated step as centrifugation and therefore involve very troublesome operations. Further, the DNA samples extracted by these methods abundantly contain RNAs, proteins and other substances interfering with the subsequent analysis. Therefore, for obtaining high-purity plasmid DNAs after such an extraction procedure, it is necessary to carry out a process for removing RNAs and proteins, which is complicated and troublesome and requires a long period of time, typically an ultrafiltration procedure utilizing a cesium chloride density gradient, or ribonuclease digestion followed by phenol/chloroform extraction.

[0004] Also known as a method of extracting plasmid DNAs in a simple and easy manner without the necessity of particularly carrying out any procedure for removing genomic DNAs and proteins is the method using hydroxyapatite as a nucleic acid-binding solid phase [Beland, F. A. et al., J. Chromatography, 174, 177-186 (1979)]. According to this method, while plasmid DNAs in the lysate solution can alone be extracted, RNAs and proteins are hardly adsorbed on hydroxyapatite and therefore the contamination with them can be substantially prevented. However, this method uses, as the eluent, such a buffer solution having a relatively high concentration as 0.3 M phosphate buffer, which inhibits such an enzymatic reaction as restriction enzyme digestion. As a result, when the plasmid DNA extracted is used in restriction enzyme digestion or sequencing or like analysis, it becomes necessary to remove the buffer agent by dialysis or gel filtration, for instance; thus, there arises the problem that a long period of time is required.

[0005] On the other hand, available as a simple and easy method of nucleic acid extraction is the method which comprises using silica as a nucleic acid-binding solid phase carrier [Japanese Kokai Publication H02-289596]. This method is advantageous in that since nucleic acids can be extracted in one stage from a biological material such as bacterial cells and further a low concentration buffer solution such as water or TE buffer is used as the eluent, no particular desalting

and concentrating procedure is required and the nucleic acids extracted can be immediately subjected to the subsequent analysis. However, when an attempt is made to extract plasmid DNAs from plasmid DNA-harboring bacterial cells by this method, not only plasmid DNAs but also genomic DNAs are adsorbed on silica. Thus, for extracting plasmid DNAs alone at good purity levels, it is essential to carry out a purification procedure such as ultracentrifugation or column chromatography.

[0006]

[Problems Which the Invention is to Solve] It is an object of the present invention to solve the above-discussed technological problems encountered in the prior art and provide a method of extracting and purifying plasmid DNAs in a short time and at high purity levels from a plasmid DNA-harboring microorganism or cells, without requiring any complicated operation.

[0007]

[Means for Solving the Problems] The present inventors made intensive investigations in an attempt to solve the above problems and, as a result, found that plasmid DNAs can be extracted and purified in a simple and easy manner from a plasmid DNA-harboring microorganism or cells by using an appropriate cytolytic solution, an appropriate organic solvent and an appropriate nucleic acid-binding solid phase carrier. Such finding has led to completion of the present invention.

[0008] Thus, the invention consists in a method of extracting and purifying plasmid DNAs which is characterized in that it comprises the following steps (a) to (c):

(a) the step of adding, mixing or contacting a cytolytic solution containing a chaotropic substance and having a pH of 3-6, an extractant comprising an organic solvent and a nucleic acid-binding solid phase carrier to or with a microorganism or cells harboring a plasmid DNA to thereby cause the plasmid DNA to be adsorbed on the solid carrier, (b) the step of washing the solid carrier with the plasmid DNA adsorbed thereon in the above step (a) with a washing solution, and (c) the step of eluting, with an eluent, the plasmid DNA from the solid carrier washed in the above step (b).

[0009] Further, the invention consists in a reagent kit for plasmid DNA extraction and purification which comprises a lyzing solution containing a chaotropic substance and having a pH of 3-6, an extractant comprising an organic solvent, a nucleic acid-binding solid phase carrier, a washing solution and an eluent.

[0010]

[Modes of Embodiment of the Invention] The plasmid DNA extraction and purification method according to the invention is broadly divided into the following three stages: (a) dissolution/adsorption step, (b) washing step and (c) elution step.

[0011] In the dissolution/adsorption step (a), the cytolytic solution, organic solvent and nucleic acid-binding solid phase carrier are added to, mixed with or contacted with a plasmid DNA-harboring microorganism or cells to dissolve the microorganism or cells and cause plasmid DNA adsorption on the nucleic acid-binding solid phase carrier.

[0012] Typical examples of the plasmid DNA-harboring microorganism or cells to be used in the practice of the invention are *Escherichia coli* transformants. In the case of such an *Escherichia coli* transformant, the transformant is generally cultivated overnight in the conventional manner using an appropriate selection medium, and cells are collected by such an operation as centrifugation for use as the starting material. The plasmid DNA which is the target of extraction is one utilized as a vector, as well known in the art. Therefore, the plasmid DNA so referred to herein naturally includes cosmid DNAs as well.

[0013][i2] The cytolytic solution to be used in the practice of the invention is adjusted to pH 3-6 by causing it to contain a buffer agent. This may be already contained in the cytolytic solution or may be added as a buffer solution after cytolysis. The buffer agent is not particularly restricted but may be any of those in general use, preferably those showing a buffering action at a pH within the range of pH 3-6. Thus, for example, sodium acetate-acetic acid, sodium acetate-hydrochloric acid and the like may be mentioned, and the concentration thereof to be employed is preferably 1-500 mM and the pH is preferably within the range of 3-6.

[0014] The cytolytic solution to be used in the practice of the invention contains a chaotropic substance. The chaotropic substance is not particularly restricted but may be any of those substances which are generally known as chaotropic substances and are effective in increasing the solubility of hydrophobic molecules in water and further contribute to plasmid DNA binding to solid phases. Specifically, there may be mentioned guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride, sodium iodide, potassium iodide, sodium perchlorate, etc. Among these, guanidine thiocyanate is preferably used. The concentration to be employed of such chaotropic substances may vary depending on the chaotropic

substance used and, in the case of guanidine thiocyanate, for instance, this is preferably used within the concentration range of 3-5.5 M.

[0015] The cytolytic solution may contain a surfactant so that the cell membrane may be destructed or the proteins contained in cells may be denatured. The surfactant is not particularly restricted but may be any of those generally used in nucleic acid extraction from cells or the like. Specifically, there may be mentioned nonionic surfactants such as polyoxyethylene octylphenyl ether, polyoxyethylenesorbitan monolaurate and polyoxyethylenesorbitan monooleate, cationic surfactants such as dodecyltrimethylammonium bromide, dodecyltrimethylammonium chloride and cetyltrimethylammonium bromide, anionic surfactants such as sodium dodecyl sulfate, N-lauroylsarcosine sodium and sodium cholate, and amphoteric surfactants such as phosphatidylethanolamine. Among these, nonionic surfactants such as polyoxyethylene octylphenyl ether and polyoxyethylenesorbitan monolaurate are preferably used. The concentration to be employed of these surfactants may vary depending on the surfactant species used and, in the case of polyoxyethylene octylphenyl ether, for instance, this is preferably used within the concentration range of 0.1%-3%.

[0016] The organic solvent to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any one that will not inhibit plasmid DNA binding to the solid phase but can inhibit genomic DNA binding to the solid phase. Presumably, the addition of such an organic solvent to the liquid phase properly decreases the polarity of the liquid phase to thereby provide plasmid DNAs and genomic DNAs differing in molecular surface polarity with selectivity in solid phase binding, although the details of this principle are unknown. As specific examples of the organic solvent to be used in the practice of the invention, there may be mentioned water-saturated phenol, buffer solution-saturated phenol, chloroform, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-propanol and acetone. Among these, water-saturated phenol or buffer solution-saturated phenol, or a mixture of such saturated phenol and chloroform in an appropriate mixing ratio is preferred.

[0017] The nucleic acid-binding solid phase carrier to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any solid that has a hydrophilic surface capable of adsorbing nucleic acids in the presence of a chaotropic ion, namely retaining them through reversible bonding. Specifically, silicon dioxide, namely silica, is preferably used. The carrier also includes silica-based substances, for example glass and diatomaceous earth, chemical

modifications or surface-treated modifications thereof, and composites thereof with such other substances as superparamagnetic metal oxides unless they inhibit such reversible binding with nucleic acids as mentioned above. The form of the nucleic acid-binding solid phase carrier is not particularly restricted but specifically includes particles, filters and reaction vessels. Among these, the form of particles is more preferred from the adsorption and elution efficiency viewpoint and, in that case, the particle diameter is more suitably 0.05-500 μm .

[0018] In the practice of the invention, the cytolytic solution, organic solvent and nucleic acid-binding solid phase may be added either separately or simultaneously.

[0019] The washing step (b) is the step of separating only the nucleic acid-binding solid phase carrier with the plasmid DNA adsorbed thereon as far as possible from the mixture comprising the cell disruption product, cytolytic solution, organic solvent and nucleic acid-binding solid phase carrier. On that occasion, the carrier is preferably washed about 1-3 times using a washing solution.

[0020] The specific means for separating the nucleic acid-binding solid phase carrier in the practice of the invention depends on the form of the solid phase carrier employed. When the nucleic acid-binding solid phase is in the form of particles, for instance, centrifugation, filtration or column operation is preferred among others. Further, when a solid phase carrier containing a superparamagnetic metal oxide within particles thereof is used, magnetic separation using a magnet or the like, which is simple and easy, becomes possible and is more appropriate.

[0021] The washing solution to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but may be any one that will not promote plasmid DNA elution from the solid phase but can prevent genomic DNA or protein binding to the solid phase. Specifically, a 3-5.5 M guanidine thiocyanate solution or 40%-100% ethanol is preferred, and the combined use of these washing solutions is more preferred. Thus, preferably, the solid phase is first washed with a guanidine thiocyanate solution and then further with 40%-100% ethanol. Further, when the cytolytic solution and organic solvent first used in the dissolution/adsorption step are used as washing solutions, genomic DNAs and proteins are more effectively removed. On that occasion, 40%-100% ethanol is preferably used in the subsequent washing.

[0022] The elution step (c) is the step of eluting the plasmid DNA from the nucleic acid-binding solid phase carrier with that DNA adsorbed thereon. Therefore, the eluent to be used in the practice of the invention is not particularly restricted but

may be any one that promotes the elution of the plasmid DNA from the solid phase. Specifically, water or TE buffer [10 mM Tris-hydrochloride buffer, 1 mM EDTA, pH 8.0] is preferred. The plasmid DNA then recovered can be directly used in an enzymatic reaction using a restriction enzyme(s) or DNA polymerase, for instance, without subjecting the same to a desalting or concentration procedure by dialysis or ethanol precipitation.

[0023] As described hereinabove, the plasmid DNA extraction/purification method according to the invention is constituted of simple steps and can obviously be applied to plasmid DNA extraction/purification kits and to nucleic acid extraction apparatus in which the solid phase separation and reagent distribution procedures are carried out automatically.

[0024]

[Examples] The following examples illustrate the present invention more specifically. These examples are, however, by no means limitative of the scope of the invention.

Example 1 Plasmid DNA extraction from *Escherichia coli* pBR322/HB101

(1) Preparation of *Escherichia coli* pBR322/HB101

LB medium [100 ml; 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l sodium chloride (pH 7.5)] containing 100 µg/ml of ampicillin] was sowed with an *Escherichia coli* HB101 transformant as transformed with the plasmid pBR322 (product of Toyobo) (pBR322/HB101), and cultivation was carried out at a cultivation temperature of 37°C and a rate of stirring of 180 rpm for 15 hours. After cultivation, the culture fluid was distributed, in 1.5-ml portions, into 1.5-ml microtubes, followed by 1 minute of centrifugation at 12,000 rpm on a high-speed refrigerated microcentrifuge (MR-150; product of Tomy Seiko). The cells obtained after removal of the supernatant were used as the extraction material.

[0025] (2) Plasmid DNA extraction/purification

The cells in each microtube as prepared in the above step (1) were lysed by adding thereto 500 µl of a cytolytic solution [4.7 M guanidine thiocyanate, 92 mM sodium acetate-hydrochloric acid (pH 4.0), 1.2% polyoxyethylene octylphenyl ether, 20 mM EDTA]. Then, 500 µl of TE buffer-saturated phenol/chloroform (1:1) was added, and the mixture was stirred vigorously. Thereto was added 40 µl of a 0.5 g/ml suspension of magnetic silica (particle diameter 1-10 µm, containing 30% of triiron tetraoxide, specific surface area 280 m²/g, pore volume 0.025 ml/g, surface pore diameter 2-6 nm; product of Suzuki Yushi), followed by 10 minutes of stirring at room temperature. Then, each microtube was placed on a magnetic stand

(MPC-M; product of Dynal), the magnetic silica particles were collected, and the supernatant was discarded. Further, the microtube was removed from the magnetic stand, 1 ml of a washing solution [5.3 M guanidine thiocyanate, 52 mM Tris-hydrochloride (pH 6.4)] was added and, after thorough mixing, the microtube was placed on the magnetic stand in the same manner, and the particles were washed by removing the supernatant. The particles were again washed with 1 ml of the washing solution in the same manner and then washed with two 1-ml portions of 70% ethanol and with one portion of 100% ethanol. After removal of the supernatant, the microtube was placed on a heat block set at 55°C and allowed to stand for 20 minutes to thereby evaporate off the ethanol in the tube and dry the particles. Thereto was added 100 µl of sterilized water and, after 10 minutes of stirring at room temperature, the mixture was placed on the magnetic stand, the magnetic silica particles were collected and the supernatant was recovered. The liquid recovered amounted to about 80 µl.

[0026] A 10-µl portion of the liquid recovered was subjected to agarose gel electrophoresis, followed by staining with ethidium bromide and photography. The results are shown in Fig. 1 (lane 3). As is evident from Fig. 1 (lane 3), it can be confirmed that the plasmid DNA could be extracted and purified at a high purity while almost no contamination with *Escherichia coli*-derived DNAs or RNAs was observed. In Fig. 1, lane 1 indicates the electrophoretic pattern of size markers resulting from PstI digestion of the lambda phage DNA, lane 2 the electrophoretic pattern of the commercially available pBR322, lane 3 the electrophoretic pattern of the pBR322 DNA extracted and purified by the method described in Example 1, lane 4 the electrophoretic pattern of the EcoRI digest derived from the commercially available pBR322 DNA, and lane 5 the electrophoretic pattern of the EcoRI digestion products derived from the pBR322 DNA extracted and purified by the method described in Example 1.

[0027] (3) Restriction enzyme digestion of plasmid DNA

To an 8-µl portion of the liquid recovered as described above under (2) were added 1 µl of 10 x H buffer [500 mM Tris-hydrochloride (pH 7.5), 1 M sodium chloride, 100 mM magnesium chloride, 10 mM dithiothreitol] and 1 µl of 1 U/µl EcoRI (product of Toyobo), and the resulting mixture was allowed to stand at 37°C for 3 hours.

[0028] The reaction mixture was subjected to agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and photography. The results are shown in Fig. 1 (lane 5). As is evident from Fig. 1 (lane 5), the plasmid DNA extracted

and purified by the method of the invention was found completely cleaved by the restriction enzyme EcoRI and could be subjected to restriction enzyme digestion.

[0029] **Example 2** Plasmid DNA extraction from *Escherichia coli* pUC19/JM109

(1) Preparation of *Escherichia coli* pUC19/JM109

A 100-ml portion of SB medium [32 g/l tryptone, 20 g/l yeast extract, 5 g/l sodium chloride, 5 ml 1 N NaOH] containing 100 µg/l of ampicillin was sowed with an *Escherichia coli* transformant (pUC19/JM109) as transformed with the plasmid pUC19 (product of Toyobo), and cultivation was carried out at a cultivation temperature of 37°C and a rate of stirring of 180 rpm for 5 hours. After cultivation, the culture fluid was distributed, in 1.5-ml portions, into 1.5-ml microtubes, followed by 1 minute of centrifugation at 12,000 rpm using a high-speed refrigerated microcentrifuge (MR-150; product of Tomy Seiko). The cells obtained after removal of the supernatant were used as the extraction material.

[0030] (2) Plasmid DNA extraction/purification

The plasmid pUC19 DNA was extracted and purified from the cells prepared as described above under (1) in the same manner as in Example 1. The cells were lyzed by adding thereto 600 µl of a cytolytic solution [5 M guanidine thiocyanate, 100 mM sodium acetate-hydrochloric acid (pH 4.0)] and then 300 µl of TE buffer-saturated phenol, followed by vigorous stirring. Thereto was added 40 µl of a 0.5 g/ml suspension of magnetic silica (particle diameter 1-10 µm, containing 30% of triiron tetraoxide, specific surface area 280 m²/g, pore volume 0.025 ml/g, surface pore diameter 2-6 nm; product of Suzuki Yushi), followed by 10 minutes of stirring at room temperature. Then, each microtube was placed on a magnetic stand (MPC-M; product of Dynal), the magnetic silica particles were collected, and the supernatant was discarded. Further, the microtube was removed from the magnetic stand, 750 µl of a cytolytic solution [5M guanidine thiocyanate, 100 mM sodium acetate-hydrochloric acid (pH 4.0) and 150 µl of TE buffer-saturated phenol were added and, after thorough mixing, the microtube was placed on the magnetic stand in the same manner, and the particles were washed by removing the supernatant. The particles were again washed in the same manner and then with two 1-ml portions of 70% ethanol. After removal of the supernatant, 100 µl of sterilized water was added to the microtube and, after 10 minutes of stirring at room temperature, the microtube was placed on the magnetic stand, the magnetic silica particles were collected and the supernatant was recovered. The liquid recovered amounted to about 100 µl.

[0031] A 3- μ l portion of the liquid recovered was subjected to agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and photography. The results are shown in Fig. 2 (lane 3). As is evident from Fig. 2 (lane 3), it can be confirmed that the plasmid DNA was extracted and purified at a high purity level while the contamination with *Escherichia coli* genome-derived DNAs or RNAs was hardly observed.

[0032] (3) Restriction enzyme digestion of plasmid DNA

In the same manner as in Example 1, 1 μ l of 10 x L buffer [100 mM Tris-hydrochloride (pH 7.5), 100 mM magnesium chloride, 10 mM dithiothreitol] and 1 μ l of 1 U/ μ l KpnI (product of Toyobo) were added to a 8- μ l portion of the liquid recovered as described above under (2), and the resulting mixture was allowed to stand at 37°C for 3 hours. The reaction mixture was subjected to agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and photography. The results are shown in Fig. 2 (lane 5). As is evident from Fig. 2 (lane 5), it can be confirmed that the plasmid DNA extracted and purified by the method of the invention was found completely cleaved by the restriction enzyme KpnI and could be immediately subjected to restriction enzyme digestion. In Fig. 2, lane 3 indicates the electrophoretic pattern of size markers resulting from PstI digestion of the lambda phage DNA, lane 2 the electrophoretic pattern of the commercially available pUC19 DNA, lane 3 the electrophoretic pattern of the pUC19 DNA extracted and purified by the method described in Example 2, lane 4 the electrophoretic pattern of the KpnI digest derived from the commercially available pUC19 DNA, and lane 5 the electrophoretic pattern of the KpnI digest derived from the pUC19 DNA extracted and purified by the method described in Example 2.

[0033]

[Effects of the Invention] According to the invention, plasmid DNAs can be extracted and purified from a plasmid DNA-harboring microorganism or cells in a short period of time and in a simple and easy manner by causing specific adsorption of the plasmid DNA at a high purity level using a chaotropic substance-containing lyzing solution with a pH of 3-6 and a nucleic acid-binding solid phase carrier and further using an appropriate eluent, without the necessity of any complicated after-treatment procedure.

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1] This is a photograph, in lieu of a drawing, showing the agarose gel electrophoretic patterns of the plasmid pBR322 DNA extracted and purified by the

method of the invention and of the restriction enzyme digest thereof.

[Fig. 2] This is a photograph, in lieu of a drawing, showing the agarose gel electrophoretic patterns of the plasmid pUC19 DNA extracted and purified by the method of the invention and of the restriction enzyme digest thereof.

FIG. 1

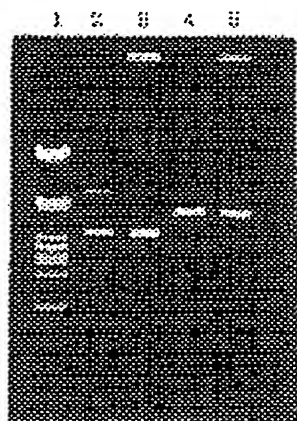


FIG. 2

